

PCT

世界知的所有権機関
国際事務局

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類7 C12N 15/52, 1/21, G01N 33/50, A61K 38/43	A1	(11) 国際公開番号 WO00/43522 (43) 国際公開日 2000年7月27日(27.07.00)
(21) 国際出願番号 PCT/JP00/00233 (22) 国際出願日 2000年1月19日(19.01.00) (30) 優先権データ 特願平11/11218 1999年1月19日(19.01.99) JP <i>19 July 01/30 mss</i> (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 株式会社 エイジーン研究所 (AGENE RESEARCH INSTITUTE CO., LTD.)[JP/JP] 〒247-0063 神奈川県鎌倉市梶原200番地 Kanagawa, (JP) (72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 北尾紗織(KITAO, Saori)[JP/JP] ✓ 嶋本 顕(SHIMAMOTO, Akira)[JP/JP] ✓ 古市泰宏(FURUICHI, Yasuhiro)[JP/JP] ✓ 〒247-0063 神奈川県鎌倉市梶原200番地 株式会社 エイジーン研究所内 Kanagawa, (JP) (74) 代理人 清水初志, 外(SHIMIZU, Hatsushi et al.) 〒300-0847 茨城県土浦市御町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki, (JP)		(81) 指定国 AU, CA, JP, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE) 添付公開書類 国際調査報告書 請求の範囲の補正の期限前の公開 ; 補正書受領の際には再公開される。
(54) Title: GENE CAUSATIVE OF ROTHMUND-THOMSON SYNDROME AND GENE PRODUCT ✓ (54) 発明の名称 ロスムンドートムソン症候群の原因となる遺伝子および遺伝子産物 (57) Abstract It has been clarified that RecQ4 helicase gene belonging to the RecQ helicase gene family is causative of Rothmund-Thomson syndrome. By detecting the occurrence of a mutation in this gene, Rothmund-Thomson syndrome can be examined. Further, patients with Rothmund-Thomson syndrome can be treated by using normal RecQ4 helicase gene, its protein, etc.		

RecQヘリカーゼ遺伝子ファミリーに属するRecQ4ヘリカーゼ遺伝子が、ロスマンドートムソン症候群の原因遺伝子であることを解明した。この遺伝子に変異が存在するか否かを検出することにより、ロスマンドートムソン症候群の検査を行うことが可能であることを見出した。さらに、正常なRecQ4ヘリカーゼ遺伝子やそのタンパク質等を利用して、ロスマンドートムソン症候群患者の治療を行うことが可能であることを見出した。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AG	アンティグア・バーブーダ	DZ	アルジェリア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AL	アルバニア	EE	エストニア	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LK	スリ・ランカ	SG	シンガポール
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AU	オーストラリア	FR	フランス	LS	レソト	SK	スロヴァキア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LU	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LV	ラトヴィア	SZ	スワジランド
BE	ベルギー	GE	グルジア	MA	モロッコ	TD	チャード
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MC	モナコ	TG	トーゴ
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BJ	ベナン	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BR	ブラジル	GR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TR	トルコ
BY	ベラルーシ	GW	ギニア・ビサウ		共和国	TT	トリニダード・トバゴ
CA	カナダ	HR	クロアチア	ML	マリ	TZ	タンザニア
CF	中央アフリカ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	UA	ウクライナ
CG	コンゴ	ID	インドネシア	MR	モーリタニア	UG	ウガンダ
CH	スイス	IE	アイルランド	MW	マラウイ	US	米国
CI	コートジボワール	IL	イスラエル	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CM	カメルーン	IN	インド	MZ	モザンビーク	VN	ヴェトナム
CN	中国	IS	アイスランド	NE	ニジェール	YU	ユーゴスラヴィア
CR	コスタ・リカ	IT	イタリア	NL	オランダ	ZA	南アフリカ共和国
CU	キューバ	JP	日本	NO	ノルウェー	ZW	ジンバブエ
CY	キプロス	KE	ケニア	NZ	ニュージーランド		
CZ	チェッコ	KG	キルギスタン	PL	ポーランド		
DE	ドイツ	KP	北朝鮮	PT	ポルトガル		
DK	デンマーク	KR	韓国	RO	ルーマニア		

明細書

ロスムンドートムソン症候群の原因となる遺伝子および遺伝子産物

技術分野

本発明は、ロスムンドートムソン症候群の原因遺伝子、該疾患の検査方法、および該疾患の検査薬および治療薬に関する。

背景技術

ロスムンドートムソン症候群(Rothmund-Thomson syndrome (RTS)); 先天性多形皮膚萎縮症(poikiloderma congenital))は、稀な常染色体劣勢遺伝病であり、その病態生理や原因遺伝子は未だ解明されていない。1868年に、バイエルン地方の孤立した村で、若年で多形皮膚萎縮症を発症し、若年性白内障の高い発症率を示す10人の患者を、ドイツの眼科医、オーグスト・ロスムンド (August Rothmund) が初めて報告した (A. Rothmund, Arch. Ophthalmol. 4:159 (1887))。1936年になって、英国の眼科医シドニー・トムソン (Sidney Thomson) が多形皮膚萎縮症のよく似た3人の患者を報告した (M.S. Thomson, Br.J.Dermatol. 48:221 (1936))。そのうち2人は骨に異常を有していた。今日、これらの2つの重複する臨床事例はロスムンドートムソン症候群 (RTS) として知られている。この疾患は様々な人種の子供に関して世界的に報告されており、これまでに200を超えるロスムンドートムソン症候群の事例がベノスらにより報告されている (E.M. Vennos et al., J.Am.Acad.Dermatol. 27:750 (1992); E.M. Vennos and W.D. James, Dermatol.Clinics. 13:143 (1995))。ロスムンドートムソン症候群の臨床的な情報は豊富であるものの、診断に関しては臨床的な背景に頼らざるを得ず、実験室で行いうる確立した検査方法は見出されていない。

ロスムンドートムソン症候群の臨床症状には、色素過剰および欠乏が混合した

領域を伴う新生児期の皮膚の萎縮および毛細管拡張、若年の白髪化および脱毛、若年白内障、低身長、先天性骨格異常、並びに間充織腫瘍のリスクの増大が含まれる。細胞遺伝学的研究から、ロスムンドートムソン症候群患者由来の細胞は遺伝的に不安定でしばしば染色体の組換えが起こり、後天的体細胞モザイク形成 (mosaicism) が生じることが示されている (K.L. Ying et al., J.Med.Genet. 27:258 (1990); V.M. Der Kaloustian et al., Am.J.Med.Genet. 37:336 (1990); K.H. Orstavik et al., J.Med.Genet. 31:570 (1994); M. Miozzo et al., Int.J.Cancer 77:504 (1998); N.M. Lindor et al., Clin.Genet. 49:124 (1996))。患者細胞の遺伝的不安定性、若年での不十分な身体発達、皮膚の異常、および腫瘍形成の高いリスクなどの、細胞遺伝学的および臨床的所見のいくつかは、ウェルナー症候群 (Werner syndrome) やブルーム症候群 (Bloom syndrome) の所見と類似している。

ウェルナー症候群およびブルーム症候群の原因遺伝子 (それぞれWRNおよびBLM) は、共にRecQ DNAヘリカーゼファミリーに属し、DNAヘリカーゼをコードする大腸菌のRecQ遺伝子のホモログとして同定された (K. Nakayama et al., Mol.Gen.Genet. 200:266 (1985))。大腸菌のRecQ DNAヘリカーゼの真核生物のホモログとしては、他に出芽酵母 (*S. cerevisiae*) のSGS1および分裂酵母 (*S. pombe*) のrql⁺が同定されており、酵母のSGS1およびrql⁺の変異は、出芽酵母 (*S. cerevisiae*) 細胞においては相同組換えや非相同組換えが高頻度で起こり、分裂酵母 (*S. pombe*) 細胞においてはS期において組換えが高頻度で起こることが知られている (S. Gangloff et al., Mol.Cell.Biol. 14:8391 (1994); P.M. Watt et al., Cell 81:253 (1995); E. Stewart et al., EMBO J. 16:2682 (1997))。

ロスムンドートムソン症候群の原因遺伝子については、調べられた3人のロスムンドートムソン症候群患者のうち2人が第8染色体のトリゾミーのモザイクが起きていたことから、原因遺伝子は第8染色体にあると予想されている (N.M. Lindor et al., Clin.Genet. 49:124 (1996))。しかしながら、その原因遺伝子はこれ

まで同定されていなかった。

発明の開示

本発明は、ロスムンドートムソン症候群の原因遺伝子を解明することを課題とする。さらに該疾患の検査方法並びに該疾患の検査薬および治療薬を提供することを課題とする。

本発明者らは、RecQヘリカーゼ遺伝子ファミリーに属するRecQ4ヘリカーゼ遺伝子をコードするcDNAをすでに単離している（特願平9-200387）。本発明者らは、このRecQ4ヘリカーゼ遺伝子がロスムンドートムソン症候群の原因遺伝子である可能性があると考え、RecQ4ヘリカーゼをコードするゲノムDNAを単離し、その配列情報を基に作成したプライマーを利用して、ロスムンドートムソン症候群患者におけるRecQ4ヘリカーゼ遺伝子の変異の有無を調べた。その結果、試験した7人のロスムンドートムソン症候群患者中3人が、RecQ4遺伝子の変異をヘテロに複合して持つことを見出した。これらの患者のうち2人は兄弟であり、この2人のそれぞれの変異アレルは患者家系において遺伝したものであり、その患者由来の細胞にはRecQ4の転写の異常が特異的に見られたことから、RecQ4遺伝子の変異が遺伝的不安定をもたらし、ロスムンドートムソン症候群の原因となっていると考えられた。即ち、本発明者らは、RecQ4遺伝子がロスムンドートムソン症候群の原因遺伝子であることを初めて実証することに成功した。

さらに、この事実に基づき、RecQ4ヘリカーゼ遺伝子の変異を検出することによりロスムンドートムソン症候群の検査を行うことや、該変異を相補することにより該疾患の治療を行うことが可能であることを見出すに至った。

本発明は、ロスムンドートムソン症候群の原因遺伝子、該疾患の検査方法、並びに該疾患の検査薬および治療薬に関し、より具体的には、

- (1) RecQ4ヘリカーゼをコードするゲノムDNA、
- (2) (1)に記載のゲノムDNAを含むベクター、

- (3) (2)に記載のベクターを保持する宿主細胞、
- (4) RecQ4ヘリカーゼをコードするDNAまたはその発現調節領域にハイブリダイズし、少なくとも15ヌクレオチドの鎖長を有する、ロスマンドートムソン症候群の検査に用いるためのDNA、
- (5) RecQ4ヘリカーゼをコードするDNAを有効成分とする、ロスマンドートムソン症候群治療薬、
- (6) RecQ4ヘリカーゼを有効成分とする、ロスマンドートムソン症候群治療薬、
- (7) RecQ4ヘリカーゼに結合する抗体を有効成分とする、ロスマンドートムソン症候群検査薬、
- (8) RecQ4ヘリカーゼをコードするDNAまたはその発現調節領域の変異を検出することを特徴とする、ロスマンドートムソン症候群の検査方法、
- (9) (8)に記載のロスマンドートムソン症候群を検査する方法であって、
 - (a) 患者からDNA試料を調製する工程、
 - (b) (4)に記載のDNAをプライマーとして用いて患者由来のDNAを増幅し、塩基配列を決定する工程、
 - (c) 決定した塩基配列を健常者の対照と比較する工程、を含む方法、
- (10) (8)に記載のロスマンドートムソン症候群を検査する方法であって、
 - (a) 患者からRNA試料を調製する工程、
 - (b) 大きさに応じて調製したRNAを分離する工程、
 - (c) (4)に記載のDNAをプローブとして用いて、分離したRNAに対しハイブリダイズさせる工程、
 - (d) ハイブリダイズしたRNAを検出し、健常者の対照と比較する工程、を含む方法、
- (11) (8)に記載のロスマンドートムソン症候群を検査する方法であって

- 、
- (a) 患者からDNA試料を調製する工程、
 - (b) (4)に記載のDNAをプライマーとして用いて患者由来のDNAを増幅する工程、
 - (c) 増幅したDNAを一本鎖DNAに解離させる工程、
 - (d) 解離させた一本鎖DNAを非変性ゲル上で分離する工程、
 - (e) 分離した一本鎖DNAのゲル上での移動度を健常者の対照と比較する工程、を含む方法、
- (12) (8)に記載のロスンドートムソン症候群を検査する方法であって

- 、
- (a) 患者からDNA試料を調製する工程、
 - (b) RecQ4ヘリカーゼをコードするDNAまたはその発現調節領域中におけるロスンドートムソン症候群に特異的な変異塩基と塩基対を形成する塩基を含むオリゴヌクレオチドをプライマーの少なくとも一つとして用いて患者由来のDNAを増幅する工程、
 - (c) 増幅したDNA断片を検出する工程、を含む方法、
- (13) (8)に記載のロスンドートムソン症候群を検査する方法であって

- 、
- (a) 患者からDNA試料を調製する工程、
 - (b) ロスンドートムソン症候群に特異的な変異塩基を挟み込むように調製された一对の(4)に記載のDNAをプライマーとして用いて、患者由来のDNAを増幅する工程、
 - (c) 得られた増幅産物に対し、下記の(i)から(iv)のいずれか的一对のオリゴヌクレオチド；

(i) 増幅産物中の変異塩基と塩基対を形成する塩基が3'末端となるように合成したオリゴヌクレオチドおよび該3'末端の隣りの塩基(3'側)が5'末

端となるように合成したオリゴヌクレオチド、

(ii) 増幅産物中の変異塩基に対応する健常者における塩基と対を形成する塩基が3'末端となるように合成したオリゴヌクレオチドおよび該3'末端の隣りの塩基(3'側)が5'末端となるように合成したオリゴヌクレオチド、

(iii) 増幅産物中の変異塩基と塩基対を形成する塩基が5'末端となるように合成したオリゴヌクレオチドおよび該5'末端の隣りの塩基(5'側)が3'末端となるように合成したオリゴヌクレオチド、

(iv) 増幅産物中の変異塩基に対応する健常者における塩基と対を形成する塩基が5'末端となるように合成したオリゴヌクレオチドおよび該5'末端の隣りの塩基(5'側)が3'末端となるように合成したオリゴヌクレオチド、をハイブリダイズさせ、これらオリゴヌクレオチドを連結する工程、および

(d) 連結したオリゴヌクレオチドを検出する工程、を含む方法、

(14) (8)に記載のロスムンドートムソン症候群の検査方法であって、

(a) 患者からタンパク質試料を調製する工程、

(b) RecQ4ヘリカーゼに対する抗体を、調製したタンパク質試料に接触させる工程、

(c) 該抗体に結合するタンパク質を検出する工程、を含む方法、に関する。

本発明は、第一に、ロスムンドートムソン症候群(RTS)の原因遺伝子に関する。本発明者らにより、ロスムンドートムソン症候群の原因遺伝子がヒトRecQ4ヘリカーゼをコードすることが見出された。本発明者らにより決定されたRecQ4ヘリカーゼをコードするゲノムDNAの塩基配列を配列番号：1(発現調節領域)および配列番号：2(エキソンおよびイントロン領域)に示す。

本発明のRecQ4ヘリカーゼをコードするゲノムDNAは、配列番号：1～3のいずれかに記載の塩基配列の一部または全部をプローブとして用いて、ハイブリダイゼーションによりゲノムDNAライブラリーをスクリーニングして得ることができ

るほか、配列番号：1または2に記載の塩基配列の一部をプライマーとして用いて、ゲノムDNAまたはゲノムDNAライブラリーを鋳型として、ポリメラーゼ連鎖反応により増幅し、単離することもできる。

本発明のゲノムDNAは、後述するように、ロスマンドートムソン症候群の検査のためのプライマーやプローブの調製、ロスマンドートムソン症候群の遺伝子治療、RecQ4ヘリカーゼの製造などの目的に利用し得る。

本発明は、また、RecQ4ヘリカーゼをコードするDNAまたはその発現制御領域にハイブリダイズし、少なくとも15ヌクレオチドの鎖長を有する、ロスマンドートムソン症候群の検査に用いるためのDNAに関する。このDNAは、好ましくはRecQ4ヘリカーゼをコードするDNAまたはその発現制御領域に特異的にハイブリダイズするものである。

ここで「特異的にハイブリダイズする」とは、通常のハイブリダイゼーション条件下、好ましくはストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で、他のタンパク質をコードするDNAまたはRNAとクロスハイブリダイゼーションが有意に生じないことを指す。このようなDNAは、標的配列に完全に相補的でなくてもよいが、通常、少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%、より好ましくは90%（例えば95%以上）の塩基配列上の相補性を有する。

プライマーとして用いられる場合、オリゴヌクレオチドは、通常、15 mer～35 merであり、好ましくは20 mer～28 merである。

プライマーは、RecQ4ヘリカーゼのコード領域またはその発現を調節する領域の少なくとも一部を増幅しうるものであればいかなるものでもよい。このような領域としては、例えば、RecQ4ヘリカーゼ遺伝子のエキソン領域、イントロン領域、プロモーター領域、およびエンハンサー領域が含まれる。

一方、プローブとしてのヌクレオチドは、合成オリゴヌクレオチドであれば、通常、少なくとも15塩基以上の鎖長を有する。プラスミドDNAなどのベクターに組み込んだクローンから得た二本鎖DNAをプローブとして用いたり、該クローンから

転写によりRNAを合成してプローブとして用いることも可能である。プローブとして利用する領域としては、RecQ4ヘリカーゼのコード領域またはその発現を調節する領域の少なくとも一部に特異的にハイブリダイズするものであればいかなるものでもよい。プローブがハイブリダイズする領域としては、例えば、RecQ4ヘリカーゼ遺伝子のエキソン領域、イントロン領域、プロモーター領域、エンハンサー領域が含まれる。

プローブとして用いる場合、オリゴヌクレオチド、二本鎖DNA、またはRNAは適宜標識して用いられる。標識する方法としては、例えばオリゴヌクレオチドの場合には末端標識法、二本鎖DNAの場合にはランダムプライマー法、PCR法、RNAの場合にはin vitro転写ラベル法が挙げられる。標識化合物としては末端標識法の場合には $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP、ランダムプライマー法、PCR法の場合には $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dCTPまたはジゴキシゲニン(digoxigenin/DIG)-dUTP、in vitro転写ラベル法の場合には $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ CTPまたはDIG-UTPが挙げられる。

本発明における「ロスンドートムソン症候群の検査」は、RecQ4ヘリカーゼ遺伝子の変異を検出することを特徴とする。本発明において「ロスンドートムソン症候群の検査」とは、RecQ4ヘリカーゼ遺伝子の変異に起因してロスンドートムソン症候群の症状を発現している患者の検査のみならず、被験者がRecQ4ヘリカーゼ遺伝子の変異に起因するロスンドートムソン症候群にかかりやすいか否かを判断するために行う検査も含まれる。

また、本発明における「RecQ4ヘリカーゼ遺伝子の変異の検出」には、DNAレベルにおける検出、RNAレベルにおける検出の他、タンパク質レベルにおける検出が含まれる。

本発明の検査方法の一つの態様は、患者のRecQ4ヘリカーゼ遺伝子の塩基配列を直接決定する方法である。該方法は、(a) 患者からDNA試料を調製する工程、(b) 本発明のDNAをプライマーとして用いて患者由来のDNAを増幅し、塩基配列を決定する工程、および(c) 決定した塩基配列を健常者の対照と比較する工程、

を含む。塩基配列の直接決定には、RecQ4ゲノムDNAの塩基配列を直接決定する場合と、RecQ4 cDNAの塩基配列を直接決定する場合とがある。

RecQ4ゲノムDNAの塩基配列を直接決定する場合は、患者からゲノムDNAを調製し、RecQ4遺伝子特異的なセンスプライマーとアンチセンスプライマーを用いて患者のゲノムDNAからRecQ4遺伝子を増幅する。RecQ4遺伝子の増幅におけるプライマーの長さは20 mer~28 merでTm値は65°C~75°Cが好ましい。またセンスプライマーとアンチセンスプライマーによって増幅されるRecQ4ゲノムDNAの長さは1 kb~1.5 kbであることが好ましい。またセンスプライマーとアンチセンスプライマーは、増幅されるRecQ4ゲノムDNA断片の5' および3' 末端の50 bp~100 bpが他の断片と重なり、RecQ4ゲノムDNAの全領域およそ6.5 kbをカバーするように設定することが好ましい。さらに、RecQ4遺伝子の発現調節領域を増幅し、検査の対象にしてもよい。増幅された断片の塩基配列決定は、例えば、Hattori ら [Electrophoresis 13, pp560-565 (1992)] により記載された PCRをベースにした方法により行うことができる。即ち、Perkin Elmer社製の蛍光ダイデオキシターミネーターを含むPRISMシーケンシングキットを使って反応を行い、この際増幅されたRecQ4ゲノムDNA断片に特異的なプライマーを用いる。次いで、Applied Biosystems社製のオートシーケンサー（モデル ABI 373）で塩基配列を読み取り、附属のMacintoshコンピューターによりデータの解析を行う。変異の判定は、例えばSequencing Analysis (Applied Biosystems社製)のような塩基配列解析ソフトを用いて、塩基配列を四色の波形のピークで表わすことにより解析することができる。即ち、正常なRecQ4遺伝子のゲノムDNAの塩基配列を表わす波形のピークと患者のRecQ4遺伝子のゲノムDNAの塩基配列を表わす波形のピークを比較することにより変異を検出することができる。またさらには、DNASISのような塩基配列編集ソフトで配列を解析することにより行うことができる。即ち、コンピューター上で正常なRecQ4ゲノムDNA配列と患者のRecQ4ゲノムDNA配列を比較することにより、変異を検出することができる。

RecQ4 cDNAの塩基配列を直接決定する場合は、患者から調製したRNA試料から逆転写によりcDNAを調製し、RecQ4遺伝子特異的なセンスプライマーとアンチセンスプライマーを用いて患者のcDNAからRecQ4遺伝子を増幅する。RecQ4遺伝子の増幅におけるプライマーの長さは20 mer~28 merでT_m値は65°C~75°Cが好ましい。またセンスプライマーとアンチセンスプライマーによって増幅されるRecQ4 cDNAの長さは1 kb~1.5 kbが好ましい。またセンスプライマーとアンチセンスプライマーは、増幅されるRecQ4 cDNA断片の5' および3' 末端の50 bp~100 bpが他の断片と重なり、RecQ4 cDNAの全領域およそ4 kbをカバーするように設定することが好ましい。増幅された断片の塩基配列決定は、上記ゲノムDNAの場合と同様に、例えば、Hattori ら [Electrophoresis 13, pp560-565 (1992)] により記載された PCR をベースにした方法により行うことができる。即ち、Perkin Elmer社製の蛍光ダイデオキシターミネーターを含有するPRISMシーケンシングキットを使って反応を行い、この際増幅されたRecQ4 cDNA断片に特異的なプライマーを用いる。次いで、Applied Biosystems社製のオートシーケンサー（モデル ABI 373）で塩基配列を読み取り、附属の Macintoshコンピュータによりデータの解析を行う。変異の判定は、例えばSequencing Analysis (Applied Biosystems社製)のような塩基配列解析ソフトを用いて、塩基配列を四色の波形のピークで表わすことにより解析することができる。即ち、正常なRecQ4遺伝子のゲノムDNAの塩基配列を表わす波形のピークと患者のRecQ4遺伝子のゲノムDNAの塩基配列を表わす波形のピークを比較することにより変異を検出することができる。またさらには、DNASISのような塩基配列編集ソフトで配列を解析することにより行うことができる。即ち、コンピュータ上で正常なRecQ4 cDNA配列と患者のRecQ4 cDNA配列を比較することにより、変異を検出することができる。

本発明の検査方法としては、このように直接患者由来のDNAの塩基配列を決定する方法以外にも種々の方法を用いることができる。その一つの態様は、(a)患者からDNA試料を調製する工程、(b)本発明のDNAをプライマーとして用いて患者由来の

DNAを増幅する工程、(c)増幅したDNAを一本鎖DNAに解離させる工程、(d)解離させた一本鎖DNAを非変性ゲル上で分離する工程、および(e)分離した一本鎖DNAのゲル上での移動度を健常者の対照と比較する工程、を含む。

このような方法として、PCR-SSCP (single-strand conformation polymorphism、一本鎖高次構造多型) 法が挙げられる。PCR-SSCP法とは、同じ長さで塩基配列の異なる一本鎖DNAは分子内相互作用によって異なる高次構造をとるが故に、電気泳動上違った移動度を示すという原理に基づいている。即ち、変異をもつ一本鎖DNAは変異をもたない一本鎖DNAとは異なる高次構造とり、非変性ゲルで分離した場合に違った移動度を示し、したがって変異を検出することができる(Orita et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 1989, vol.86, pp2766-pp2770)。

PCR-SSCP法によりRecQ4ゲノムDNAあるいはRecQ4 cDNA中の配列変化を検出することができる。RecQ4ゲノムDNAから変異を検出する場合は、RecQ4遺伝子特異的なセンスプライマーとアンチセンスプライマーを用いて健常者および患者のゲノムDNAからRecQ4遺伝子を増幅する。この際プライマーは予め末端標識法により³²Pでラジオアイソトープ標識しておく。プライマーの長さは20 mer~28 merでTm値は65°C~75°Cが好ましい。またセンスプライマーとアンチセンスプライマーによって増幅されるRecQ4ゲノムDNAの長さは300 bp以内とするのが好ましい。またセンスプライマーとアンチセンスプライマーは、増幅されるRecQ4ゲノムDNA断片の5'および3'末端の60 bp~100 bpが他の断片と重なり、RecQ4ゲノムDNAの全領域およそ6.5 kbをカバーするように設定することが好ましい。増幅されたDNA断片を、厚さ0.3 mm~0.35 mm、長さ40 cmの5%非変性ポリアクリルアミドゲルで電気泳動する。ゲルをオートラジオグラフで解析し、患者のバンドの移動度を健常者のバンドの移動度と比較して変異を検出する。

RecQ4 cDNAから変異を検出する場合は、患者から調製したRNA試料から逆転写によりcDNAを調製し、RecQ4遺伝子特異的なセンスプライマーとアンチセンスプライマーを用いて健常者および患者のcDNAからRecQ4遺伝子を増幅する。この際プライ

マーは予め末端標識法により ^{32}P でラジオアイソトープ標識しておく。プライマーの長さは20 mer~28 merで T_m 値は65°C~75°Cが好ましい。またセンスプライマーとアンチセンスプライマーによって増幅されるRecQ4 cDNAの長さは300 bp以内とするのが好ましい。またセンスプライマーとアンチセンスプライマーは、増幅されるRecQ4 cDNA断片の5' および3' 末端の60 bp~100 bpが他の断片と重なり、RecQ4 cDNAの全領域およそ4 kbをカバーするように設定することが好ましい。増幅されたDNA断片を、厚さ0.3 mm~0.35 mm、長さ40 cmの5%非変性ポリアクリルアミドゲルで電気泳動する。ゲルをオートラジオグラフで解析し、患者のバンドの移動度を健常者のバンドの移動度と比較して変異を検出する。

以上は検査方法の具体的な一例であり、詳細な手順は、当業者であれば適宜変更することができる。ゲノムDNAの検査においては、発現調節領域(プロモーター領域やエンハンサー領域)の変異を検査することも考えられる。また、ゲノムDNAやcDNAの特定の領域に変異を有するか否かを検査するには、RecQ4遺伝子の全領域をカバーするDNAを調製せず、検査部位を含むDNA断片だけを調製して検査に用いることもできる。

また、患者から調製したDNAの代わりにRNAを用いても同様に検出することが可能である。このような方法は、(a) 患者からRNA試料を調製する工程、(b) 大きさに応じて調製したRNAを分離する工程、(c) 検出可能な標識をした本発明のDNAをプローブとして用いて、分離したRNAに対しハイブリダイズさせる工程、および (d) ハイブリダイズしたRNAを検出し、健常者の対照と比較する工程、を含む。具体的な方法の一例としては、患者から調製したRNAを電気泳動し、本発明のプローブDNAを用いてノーザンブロッティングを行い、シグナルの有無、強弱、および/またはゲル上での移動度の差を検出する。

これらの方法以外にも、予め選択された特定の位置の変異を検出することにより本発明の検査を行うこともできる。

このような検査方法の1つの態様は、(a)患者からDNA試料を調製する工程、(

b) RecQ4ヘリカーゼをコードするDNAまたはその発現調節領域中におけるロスミンドートムソン症候群に特異的な変異塩基と塩基対を形成する塩基を含むオリゴヌクレオチドをプライマーの少なくとも一つとして用いて患者由来のDNAを増幅する工程、および(c)増幅したDNA断片を検出する工程、を含む方法である。

このような方法としては、例えばMASA (mutant-allele-specific amplification) 法が挙げられる(松本ら、実験医学 15:2211-2217 (1977); 特開平10-201498号公報)。

MASA法とは、変異塩基と塩基対を形成する塩基を含むオリゴヌクレオチドをプライマーの一つとして、ポリメラーゼ連鎖反応により鋳型ゲノムDNAまたはcDNAを増幅し、次いで、ゲル電気泳動を行うことにより、変異アレルを検出する方法である。

本発明において、この方法を実施する場合には、鋳型DNAを増幅するために、一組のプライマー(5'側センスプライマー及び3'側アンチセンスプライマー)を合成する。ここで、5'側センスプライマーは、変異塩基と塩基対を形成する塩基を含むものを合成する。5'側センスプライマーは、変異を有するRecQ4ヘリカーゼをコードするDNAまたはその発現調節領域を鋳型とした場合に特異的にプライマーとして機能し得るが、該変異を有さないRecQ4ヘリカーゼをコードするDNAまたはその発現調節領域を鋳型とした場合はプライマーとして機能しないように設計する。この場合、5'側センスプライマーとしては、変異塩基と塩基対を形成する塩基がプライマーの3'末端となるようにすることが好ましい。一方、3'側アンチセンスプライマーとしては、変異を含まない領域に特異的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを用いる。ポリメラーゼ連鎖反応は、変異を有するDNA断片(異常アレル)が鋳型となった場合には5'側センスプライマーがハイブリダイズすることにより効率良く増幅されるような条件であり、かつ、変異のないDNA断片(正常アレル)が鋳型となった場合には5'側センスプライマーが完全にハイブリダイズすることができずに増幅効率が非常に悪くなるような条件で行う。

例えば、95℃で5分間の加熱を1回行った後、94℃で30秒間の加熱、50℃で30秒間の加熱、及び72℃で30秒間の加熱を1サイクルとしてこれを40サイクル行い、その後さらに、72℃で4分間の加熱を1回行う。

また、逆に、3'側アンチセンスプライマーとして、変異塩基と塩基対を形成する塩基を含むものを用い、5'側センスプライマーとして、変異を含まない領域に特異的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを用いて、同様にポリメラーゼ連鎖反応を行ってもよい。

その結果、変異を有する検体DNAは、変異を有するプライマーとハイブリダイズすることができるため増幅が効率よく行われ、例えば電気泳動を行った場合に、ゲル上に陽性バンドとして検出される。これに対し、正常の検体DNAは、変異を有するプライマーと完全にハイブリダイズすることができないため増幅が行われず、ゲル上にバンドは現れない。

また、上記変異を有するプライマーでの検出に加えて、該プライマーに対応する変異を有しないプライマー（変異塩基と塩基対を形成せず、正常塩基と塩基対を形成する塩基を含む）での検出を行うことにより、被験者が変異をホモに有するかヘテロで有するかを判定することも可能である。即ち、変異を有するプライマーでの検出によってバンドが検出され、変異を有しないプライマーでの検出によってバンドが検出されなかった場合に、検体DNAはロスンドートムソン症候群に関与するホモ変異を起こしているものと判定することができる。また、いずれの場合でもバンドが検出された場合には、検体DNAはヘテロ変異を起こしていると判定され、変異を有しないプライマーでの検出のみにバンドが検出されれば、検査部位に関し正常であると判定される。

本発明の検査方法の他の態様は、(a)患者からDNA試料を調製する工程、(b)ロスンドートムソン症候群に特異的な変異塩基を挟み込むように調製された一对のオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いて、患者由来のDNAを増幅する工程、(c)得られた増幅産物に対し、下記の(i)から(iv)のいずれかの一对のオリ

ゴヌクレオチド[(i)増幅産物中の変異塩基と塩基対を形成する塩基が3'末端となるように合成したオリゴヌクレオチドおよび該3'末端の隣りの塩基(3'側)が5'末端となるように合成したオリゴヌクレオチド、(ii)増幅産物中の変異塩基に対応する健常者における塩基と対を形成する塩基が3'末端となるように合成したオリゴヌクレオチドおよび該3'末端の隣りの塩基(3'側)が5'末端となるように合成したオリゴヌクレオチド、(iii)増幅産物中の変異塩基と塩基対を形成する塩基が5'末端となるように合成したオリゴヌクレオチドおよび該5'末端の隣りの塩基(5'側)が3'端となるように合成したオリゴヌクレオチド、(iv)増幅産物中の変異塩基に対応する健常者における塩基と対を形成する塩基が5'末端となるように合成したオリゴヌクレオチドおよび該5'末端の隣りの塩基(5'側)が3'端となるように合成したオリゴヌクレオチド]をハイブリダイズさせ、これらオリゴヌクレオチドを連結する工程、および(d)連結したオリゴヌクレオチドを検出する工程、を含む。

このような検出方法としては、例えば、OLA (Oligonucleotide Ligation Assay) 法が挙げられる(松本ら、実験医学 15:2211-2217 (1977); 特開平10-201498号公報)。まず、各検出対象部位(変異が予想される部位)から上流及び下流に適当な間隔をおいてプライマーを設計し、ポリメラーゼ連鎖反応を行うことにより、検出対象部位を含むゲノムDNA断片またはcDNA断片を増幅する。各検出対象部位からプライマーまでの距離は任意に設定することができるが、好ましくは、100 bp~200 bp となるように設定する。また、プライマーのヌクレオチド数については特に限定されないが、20 mer~30 merのものが好ましい。

一方、RecQ4ヘリカーゼ遺伝子の塩基配列をもとに、前記検出対象部位が3'末端となるように18~30個の長さのオリゴヌクレオチドを合成し、かつ、その3'末端に、予想される変異塩基と塩基対を形成する塩基を導入する(これにより合成されたオリゴヌクレオチドを「オリゴヌクレオチドA」と称する)。また、前記検出対象部位の隣の塩基(3'側)が5'末端となるように18~30個のオリゴヌクレオチ

ドを合成する（これにより合成されたオリゴヌクレオチドを「オリゴヌクレオチドX」と称する）。なお、変異プライマーは、正常な配列に対し公知の手法により（例えば、点突然変異誘発キット（In vitro Mutagenesisキット，宝酒造社製）を用いて）変異を導入して調製してもよく、また、変異導入後の配列を設計して化学合成してもよい。

この際、後述するリガーゼ反応により連結したオリゴヌクレオチドの精製及び検出を容易にするために、例えば、オリゴヌクレオチドAの5'末端は、ビオチンなどで標識しておき、オリゴヌクレオチドXの3'末端はジゴキシゲニン-11-ダイデオキシUTPなどで標識し、5'末端はリン酸基を付加しておく为好ましい。

次に、前記ポリメラーゼ連鎖反応反応産物に、前記オリゴヌクレオチドA及びXをアニーリングさせ、オリゴヌクレオチドAとXとを連結させる。検体のDNAに目的とする突然変異が存在する場合は、オリゴヌクレオチドAの3'端が変異塩基と塩基対を形成することができるため、オリゴヌクレオチドAとXとが連結でき、その両端にそれぞれ標識（例えば、ビオチン及びジゴキシゲニン）を持つものが作られる。

例えば、両端にビオチン及びジゴキシゲニンを有する産物であれば、これをストレプトアビジンでコートしたプレートに吸着させた後、アルカリフォスファターゼなどで標識した抗ジゴキシゲニン抗体を反応させることによって、呈色反応が生じて突然変異を検出することができる。

これに対し、検体のDNAに突然変異が存在しない場合は、オリゴヌクレオチドAの3'末端が鋳型DNAの対応する塩基と塩基対を形成することができないため、オリゴヌクレオチドAとXとが連結することができない。

従って、例えば、オリゴヌクレオチドAとXとをそれぞれビオチン及びジゴキシゲニンで標識した場合でも、両標識を両端に有するオリゴヌクレオチドが形成されず、その結果、連結反応産物をアビジンでコートしたプレートに結合させ、これにアルカリフォスファターゼなどで標識した抗ジゴキシゲニン抗体を作用さ

せても呈色反応は検出されない (Delahunty et al., Am.J.Hum.Genet. 58: 1239-1246, 1996)。

また、以下のように検出対象部位に変異を有さないDNAを特異的に検出するオリゴヌクレオチドを用いれば、被験者が変異をホモに有するか否かを判定することができる。具体的には、オリゴヌクレオチドAとオリゴヌクレオチドXとの結合実験と並行して、前記検出対象部位に変異していない正常な配列を有するオリゴヌクレオチド（オリゴヌクレオチドBとする）をオリゴヌクレオチドAと同様に合成し、オリゴヌクレオチドBとオリゴヌクレオチドXとの結合実験を行う。

その結果、オリゴヌクレオチドAとXとの結合実験によって呈色反応が生じ、オリゴヌクレオチドBとXとの結合実験によって呈色反応が生じなかった場合に、検体DNAはロスムンドートムソン症候群に関与するホモ変異を起こしているものと判定することができる。なお、オリゴヌクレオチドAとオリゴヌクレオチドXとの結合実験及びオリゴヌクレオチドBとオリゴヌクレオチドXとの結合実験のいずれの場合でも呈色反応が生じた場合はヘテロ変異であると判定され、オリゴヌクレオチドBとオリゴヌクレオチドXとの結合実験にのみ呈色反応が生じた場合は、検査部位に関し正常であると判定される。

また、その5'末端に予想される変異塩基と塩基対を形成する塩基を導入されたオリゴヌクレオチドと、前記検出対象部位の隣の塩基（5'側）が3'末端となるように調製したオリゴヌクレオチドとの組み合わせを用いることによっても、上記オリゴヌクレオチドAとXの場合と同様に検出することが可能である。

本発明の検出方法は、RecQ4ヘリカーゼに結合する抗体を用いて行うことも可能である。その1つの態様は、(a) 患者からタンパク質試料を調製する工程、(b) 調製したタンパク質試料に、RecQ4ヘリカーゼに対する抗体を接触させる工程、および(c) 該抗体に結合するタンパク質を検出する工程、を含む。

本発明の検査に用いられる抗体としては、モノクローナル抗体であっても、ポリクローナル抗体であってもよい。RecQ4ヘリカーゼに結合する抗体は、当業者に

公知の方法により調製することが可能である（例えば特願平9-200387号参照）。抗体を作成するために用いる抗原は、例えば、抗原をコードする遺伝子を適当なプラスミドベクターに組み込んで、大腸菌で遺伝子産物を発現させる、あるいはバキュロウイルスベクターに組み込んで、昆虫細胞で遺伝子産物を発現させることにより得ることもできる。また、合成ペプチドを使用してもよい。発現ベクターとしては、大腸菌で発現させる場合は、例えばpQE30（Qiagen社製）のようなベクターが、また、バキュロウイルスベクターにはpAchLT-B（PharMingen社製）のようなベクターも使用できる。この場合、遺伝子産物にFlag（Chiang, C. et al., EMBO J., 12: 2749-2762 (1993)）や6×his（Immunol.Meth. 4: 121-152 (1990)）のようなタグをつけておき、精製を容易にすることができる。発現させた遺伝子産物は、タグを利用して精製することができる。

ロスムンドートムソン症候群患者においては、RecQ4ヘリカーゼ遺伝子の変異によりフレームシフトや終止コドンが生じ、正常なRecQ4ヘリカーゼが持つC末端が欠失したタンパク質が生じると予想させる事例が複数見出された（実施例参照）。従って、RecQ4ヘリカーゼのC末端部分を認識する抗体を用いれば、ロスムンドートムソン症候群を簡便かつ効率的に検査することができる（特願平10-311284号参照のこと）。

また、本発明の抗体検査において、RecQ4ヘリカーゼのC末端領域を認識する抗体に加え、N末端領域を認識する別の抗体を組み合わせ用いれば、患者におけるRecQ4ヘリカーゼ遺伝子の変異に起因する疾患が原因遺伝子の発現異常によるものか構造異常によるものかを検査することができる。即ち、RecQ4ヘリカーゼ遺伝子の変異に起因する疾患における原因遺伝子の途中に変異が生じると、フレームシフトや終止コドンの出現により正常なC末端が欠損した翻訳産物が産生され、N末端領域は正常であるが、C末端領域では変異が生じ易いと考えられる。このため原因遺伝子の翻訳産物の構造異常が起こった場合、N末端領域に対する抗体では翻訳産物が検出されるが、C末端領域に対する抗体ではそれが検出されな

い可能性が高い。

さらに、例えばWRNヘリカーゼ遺伝子においては、変異の入ったmRNAの発現が非常に低下していることも知られており (Yamabe, Y. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 236: 151-154 (1997))、実際、RecQ4ヘリカーゼ遺伝子においても、RTS患者において有意にmRNA レベルが低下していた (実施例参照)。そのような場合は変異したRecQ4ヘリカーゼ遺伝子の翻訳産物自体が検出されないことも想定される。このようなRecQ4ヘリカーゼ遺伝子の発現異常 (発現の著しい低下) の場合には、いずれの抗体でも免疫反応は検出されないと考えられる。従って、これら両抗体を組み合わせることでロスムンドートムソン症候群の原因の検査を行うことができる。

RecQ4ヘリカーゼに結合する抗体を用いる本発明の検査は、公知の種々の免疫学的手法により行うことができる。好ましい方法としては、ウェスタンブロットが挙げられる。具体的には、患者細胞を、界面活性剤を含む緩衝液でリシスさせた後に、ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)を含む SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) で分離し、ゲルからフィルターにタンパク質を転写した後、RecQ4ヘリカーゼに結合する抗体でフィルター上の目的のタンパク質を検出することができる。また、エライザ法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA; I. Roitt et al., In "Immunology", The C.V. Mosby Co., 1989, pp25.5-25.6) や、組織切片の免疫化学染色法を用いてRecQ4ヘリカーゼの検出を行うこともできる。抗体の標識としては、例えばアルカリフォスファターゼあるいはホースラディッシュペーパーオキシダーゼ等の酵素標識を用いることができ、この場合には呈色反応で目的のタンパク質を検出することができる。また、蛍光標識を用いることもできる。目的のタンパク質の検出においては、標識を目的のタンパク質に対する抗体を認識する2次抗体に結合して用いることもでき、また、目的のタンパク質に対する抗体に結合して用いることもできる。上記のような方法を用いて、RecQ4ヘリカーゼの欠損、蓄積、または細胞内分布の異常の検査を行うことができる。

このようにRecQ4ヘリカーゼに結合する抗体はロスムンドートムソン症候群の検査に用いることが可能であるが、検査薬として用いる場合、通常、pH6～pH8程度の緩衝液（例えばリン酸緩衝液、HEPES緩衝液、またはTris緩衝液）を用い、担体（例えば1～5%程度の牛血清アルブミンまたは0.2%程度のゼラチンなど）、防腐剤（例えば0.1%のアジ化ナトリウム）等を必要に応じて混合してもよい。

本発明のこれらの検査において用いられる患者試料としては、ゲノムDNAにおける検査であればゲノムDNAを含む患者由来の任意の細胞を使用することが可能であり、またRNA、cDNA、またはタンパク質における検査であれば、健常者でRecQ4ヘリカーゼ遺伝子が発現されている細胞に対応する患者由来の細胞であれば、原理的にはどのような細胞でも使用できる。例えばバイオプシーにより得られる皮膚組織切片から確立された繊維芽細胞や、採血により得られる白血球中のB-リンパ球をEpstein-Barrウイルスによってトランスフォームした細胞などを用いることができる。

また、本発明はロスムンドートムソン症候群の治療薬に関する。その一つの態様は、RecQ4ヘリカーゼをコードするDNAを有効成分とする。RecQ4ヘリカーゼをコードするDNAを治療薬として用いる場合、RecQ4ヘリカーゼをコードするゲノムDNAの全長若しくは一部、またはRecQ4ヘリカーゼ cDNA（ヒトRecQ4ヘリカーゼをコードするcDNAを配列番号：3に示す）の全長若しくは一部をアデノウイルス及びレトロウイルス等の適当なベクターに組み込み、静脈内投与、患部への局所投与等の方法により患者に投与する。投与方法としては、インビボ法その他、エクスビボ法を用いることも可能である。

これにより患者体内における変異したRecQ4ヘリカーゼ遺伝子を正常な遺伝子に置換したり、また、正常な遺伝子を付加的に患者に投与することが可能であり、その結果、ロスムンドートムソン症候群の治療を行うことができる。

ロスムンドートムソン症候群の治療薬に関する他の態様は、RecQ4ヘリカーゼを有効成分とする。RecQ4ヘリカーゼは、天然のタンパク質として、また遺伝子組み

換え技術を利用した組換えタンパク質として調製することができる。ヒトRecQ4ヘリカーゼのアミノ酸配列を配列番号：4に示す。天然のタンパク質は、当業者に周知の方法、例えば、RecQ4ヘリカーゼに対する抗体を用いたアフィニティークロマトグラフィーを行うことにより、RecQ4ヘリカーゼ発現の高い組織や細胞（例えば、胸腺や精巣、chronic myelogenous leukemia K562細胞、promyelocytic leukemia HL-60細胞、HeLa細胞）から単離することが可能である。一方、組換えタンパク質は、例えば、RecQ4ヘリカーゼをコードするDNA（例えば、配列番号：3）で形質転換した細胞を培養することにより調製することが可能である。組換えタンパク質の生産に用いる細胞としては、哺乳類細胞、昆虫細胞、酵母細胞、および大腸菌（*E. coli*）が挙げられる。用いられる発現ベクター、宿主細胞へのベクターの導入、および得られた形質転換体からの組換えタンパク質の精製は、公知の方法を用いて行うことができる。得られたRecQ4ヘリカーゼをロスムンドートムソン症候群の治療薬として用いる場合には、RecQ4ヘリカーゼを直接投与することもできるが、公知の製剤学的製造法により製剤化して投与することもできる。例えば、薬剤として一般的に用いられる媒体、例えばPBSの様な中性の溶液に溶かして投与しうる。投与量は、患者の体重、年齢、健康度、あるいは投与方法などの諸要因に応じて変動するが、当業者であれば適宜適当な投与量を選択することができる。投与は、例えば、皮下投与、経口投与、患部への直接投与などの方法で行うことができる。

ロスムンドートムソン症候群の治療薬に関する他の態様は、RecQ4ヘリカーゼの発現を促進・上昇させる化合物を有効成分とする。

ロスムンドートムソン症候群の発症には、RecQ4ヘリカーゼ遺伝子の発現の低下が密接に関与している場合も考えられる。従って、RecQ4ヘリカーゼ遺伝子の発現を促進・上昇させることにより、ロスムンドートムソン症候群の治療を行うことも考えられる。

RecQ4ヘリカーゼ遺伝子の発現を促進・上昇させる化合物のスクリーニングは、

RecQ4ヘリカーゼ遺伝子の発現調節領域（プロモーター領域やエンハンサー領域）をルシフェラーゼ・レポーターベクターに組み込み、培養細胞に導入して、導入細胞中でルシフェラーゼ活性を促進・上昇させる化合物としてスクリーニングできる。ヒトRecQ4ヘリカーゼ遺伝子の発現調節領域の塩基配列を配列番号：1に示す。レポーター遺伝子としてはホタルルシフェラーゼ遺伝子やウミシイタケルシフェラーゼ遺伝子が挙げられる。またこれらのレポーター遺伝子をもつベクターとしては、ホタルルシフェラーゼレポーターベクターpGL3や、ウミシイタケルシフェラーゼレポーターベクターpRL（Promega社製）が挙げられる。導入細胞としてはヒト293細胞、HeLa細胞、K562細胞やサルCOS7細胞が挙げられる。細胞への導入方法としてはリン酸カルシウム沈殿法、リポソーム法、電気パルス法等の公知の方法を用いて行うことができる。本発明においてこの方法を実施する場合にはヒトRecQ4ヘリカーゼ遺伝子のプロモーター領域を組み込んだレポーター遺伝子を上述の方法によりヒトあるいはサルの培養細胞に導入し培養する。培養中に種々の被検試料を培養液中に添加し、48時間後に細胞抽出液を調製し、文献（Yamabe et al., Mol.Cell.Biol., 1998, vol. 18, pp6191-pp6200.）に記載の方法で細胞抽出液中のルシフェラーゼ活性を検出する。以上の操作によりRecQ4ヘリカーゼ遺伝子の発現を促進・上昇させる化合物が同定される。スクリーニングに用いる被検試料としては、例えば細胞抽出液、遺伝子ライブラリーの発現産物、合成低分子化合物、合成ペプチド、天然化合物などが挙げられるが、これらに制限されない。

RecQ4ヘリカーゼ遺伝子の発現を促進・上昇させる物質を疾患の治療薬として用いる場合には、上記RecQ4ヘリカーゼを治療薬として用いる場合と同様に、公知の製剤学的製造法により製剤化して投与することができる。

図面の簡単な説明

図1は、(A)はロスマンドートムソン症候群患者およびその家族の家系図を示

す写真である。Iは親を表し、1は父親、2は母親を表す。半分が黒い四角および丸はRecQ4遺伝子の1つのアレルに変異を持つ保因者を表す。IIはその兄弟姉妹（1～6）を表す。全て黒い四角（II.3、男性）および丸（II.6、女性）はロスムンドートムソン症候群患者を表し、RecQ4遺伝子の2つのアレル両方に変異を持つ。I 1.2、II.4、およびII.5はロスムンドートムソン症候群患者ではないので解析されていない。影付きで表したII.1は、臨床所見による診断ではロスムンドートムソン症候群患者と診断される。

（B）はロスムンドートムソン症候群患者およびその両親のRecQ4遺伝子の変異解析の結果を表す図である。レーンI.1は父親、レーンI.2は母親、レーンII.3は患者II.3、レーンII.6は患者II.6の結果を表す。これらの結果から、母親にはその親から遺伝した1つのアレルに7塩基の欠失（mut-1）があることがわかった。

図2は、RecQ4遺伝子の変異領域の直接塩基配列解析の結果を表す図である。

（a）にはmut-1を含む領域（タンパク質コード領域の残基1641～1672）の塩基配列を、正常および変異RecQ4遺伝子について示した。mut-1（7塩基欠失）の取り囲む領域を、健常人並びにロスムンドートムソン症候群患者II.2およびII.6より調製したゲノムDNAを用いてPCRにより増幅し、塩基配列を解析した。正常および変異配列を、シーケンス結果の下に示した。

（b）にはmut-2を含む領域（タンパク質コード領域の残基2257～2280）の塩基配列を、正常および変異RecQ4遺伝子について示した。mut-2（CからTへの変異）の取り囲む領域を、健常人並びにロスムンドートムソン症候群患者II.2およびII.6より調製したゲノムDNAを用いてPCRにより増幅し、（a）と同様に解析した。

図3は、mut-1～mut-4により生じる欠失RecQ4ヘリカーゼ分子の模式図である。「正常」はクローニングされたRecQ4遺伝子のコード領域から予想される、1208アミノ酸の完全なRecQ4ヘリカーゼを表す。影を付けた領域は全てのRecQヘリカーゼで保存されているヘリカーゼドメインを表す。

図4は、ロスムンドートムソン症候群患者細胞におけるRecQ4遺伝子発現の抑制

的調節を調べた結果を示す写真である。ロスムンドートムソン症候群患者由来の細胞のRecQ4遺伝子の転写産物を、健常人のそれらと比較した。RecQ4遺伝子に変異が見られたロスムンドートムソン症候群患者 (II.3、AG05013)、RecQ4遺伝子に変異を持たない他の3人のロスムンドートムソン症候群患者 (NIA, Aging Cell Repository由来のAG05139およびAG03587A、並びにR. Miller博士より供与されたTC4398)、および健常人に由来する皮膚繊維芽細胞からポリ(A)⁺ RNAを調製し、RecQ4遺伝子のヘリカーゼドメインから調製したプローブを用いてノーザンブロット解析を行った。内部標準としてGAPDH mRNAを用いた測定も行った。レーン1は健常人、レーン2はII.3、レーン3はAG05013、レーン4はAG05139、レーン5はAG03587、レーン6はTC4398の結果である。

図5は、大腸菌で合成、精製したRecQ4部分蛋白質を示す写真である。RecQ4のC末端領域の302アミノ酸を大腸菌で合成した。精製及び透析後の蛋白質はSDS-PAGEで泳動し、泳動後のゲルをCBB染色した。分子量は約41 kDであった。レーンM: 低分子量マーカー; 1 μ g、レーン1: 精製蛋白質; 1 μ l、レーン2: 精製蛋白質; 2 μ l。

図6は、正常細胞及びRTS患者細胞を用いたウエスタンブロット解析を示す写真である。全細胞抽出液をそれぞれ100 μ gずつを、7.5%アクリルアミドゲルで泳動して、RecQ4のウエスタンブロッティングを行った。また、蛋白総量のコントロールとしては、全細胞抽出液を10 μ gずつ用いたアクチンのウエスタンブロッティングを行った。レーン1: WI38/SV40、レーン2: RTS-B (mut-1, 2)、レーン3: RTS-E (mut-3, 4)、レーン4: RTS-C (変異なし)、レーン5: RTS-F (変異なし)。

図7は、蛍光抗体染色法によるRecQ4の細胞内局在の解析を示す写真である。K562細胞はサイトスピンでスライドガラスに接着し、抗RecQ4抗体2 μ g/mlを用いて免疫染色を行った (A)。Bは同視野の透過光像で、細胞の形態がわかる。

発明を実施するための最良の形態

以下、実施例により本発明をさらに詳細に説明するが本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

[実施例 1] RecQ4ヘリカーゼ遺伝子のゲノムDNAのクローニング

ヒトRecQ4遺伝子のゲノムDNAはP1/PACライブラリーのスクリーニングによって得られた。P1/PACライブラリーは[Smoller, et al., Chromosoma, 1991, vol. 100, pp487-pp494.]に作製法が記載されており、Genome Systems社製のものを用いた。スクリーニングはRecQ4遺伝子の第21エキソンの塩基配列に相当するセンスプライマーQ4P (5'-CGC TTC TGG AGA AAA TAC CTG CAC-3'/配列番号：9)およびアンチセンスプライマーQ4Q (5'-TTG GAG CCT CCT CGT TCC CAC ACC-3'/配列番号：10)を用いてPCRにより行った。またスクリーニングはGenome Systems社によって行われた。スクリーニングによって得られたP1クローン#13447からのDNAの単離・精製は[Smoller, et al., Chromosoma, 1991, vol. 100, pp487-pp494.]に記載の方法により行った。精製したP1 DNAを鋳型にしてRecQ4遺伝子のゲノム塩基配列を決定した。決定された、RecQ4ヘリカーゼをコードするゲノムDNA (第1エキソンから第21エキソンまで) の塩基配列を配列番号：2に示す。塩基配列決定法はHattori ら [Electrophoresis 13, pp560-565 (1992)] により記載されたPCRをベースにした方法により行った。即ち、Perkin Elmer社製の蛍光ダイデオキシターミネーターを含有するPRISMシーケンシングキットを使って反応を行った。そしてApplied Biosystems社製のオートシーケンサー (モデル ABI 373) で塩基配列を読み取り、附属の Macintoshコンピュータによりデータを解析した。塩基配列決定に用いたRecQ4遺伝子特異的プライマーは表1の通りであった。

表 1

Q4 137s	(5'-GTT TCC TGA ACG AGC AGT TCG ATC-3' /配列番号 : 11)
Q4 714s	(5'-GCT GCC TCC AGT TGC TTT TGC CTG-3' /配列番号 : 12)
Q4 A2	(5'-TTG GTC GCA GCC CGA TTC AGA TGG-3' /配列番号 : 13)
Q4 A3	(5'-TGG CCC GTG GTA CGC TTC AGA GTG-3' /配列番号 : 14)
Q4 A5	(5'-GAC GGC TGC GCG GGA GAT TCG CTG-3' /配列番号 : 15)
Q4 A9	(5'-CTC AGC CCC TCC AGT CAA GCT AGG-3' /配列番号 : 16)
Q4 C5	(5'-ACC AGT GCC TCA GGT GTC AGC-3' /配列番号 : 17)
Q4 C8	(5'-GGA AAT GTG CTG GGA AAG GAG-3' /配列番号 : 18)
Q4 D5	(5'-ACC AAG AGT CCA CAG CCT ACG-3' /配列番号 : 19)
Q4 D7	(5'-GCT CCG TGG AGT TTG ACA TGG-3' /配列番号 : 20)
Q4 D9	(5'-AGC GCA GCA CCA GGC TCA AGG-3' /配列番号 : 21)
Q4 D13	(5'-GCA CTG CTT CCT GGG CCT CAC AGC-3' /配列番号 : 22)
Q4 E	(5'-GGG TAC AGC GAG CCT TCA TGC AGG-3' /配列番号 : 23)
Q4 E128	(5'-CTC GAT TCC ATT ATC ATT TAC TGC-3' /配列番号 : 24)
Q4 F	(5'-CTG GGC AGG AGC GTG CAG TCA TGC-3' /配列番号 : 25)
Q4 G	(5'-AGG GGA GAG ACG ACC AAC GTG AGG-3' /配列番号 : 26)
Q4 H1	(5'-TTA GGA TCC GGG GTG CTT GTG GAG TTC AGT G-3' /配列番号 : 27)
Q4 H2	(5'-TTA GGA TCC CAG CTT ACC GTA CAG GCT TTG G-3' /配列番号 : 28)
Q4 K	(5'-TCC TGG CTG TGA AGA GGC TGG TAC-3' /配列番号 : 29)
Q4 L	(5'-ATC CCC CAA TGC AGT GCA GTC AGC-3' /配列番号 : 30)
Q4 U	(5'-AAT CTG GGA CCT CAC TGT GAC ATC-3' /配列番号 : 31)
Q4 Z	(5'-AGG GTG CCT TTC AGA TTG GCC TTG-3' /配列番号 : 32)

塩基配列を解析した結果、RecQ4遺伝子は21個のエキソンと20個のイントロンで構成され、その全長はおよそ6.5 kbであることが判明した。

【実施例2】 RecQ4ヘリカーゼ遺伝子のプロモーター領域のクローニング

ヒトRecQ4遺伝子のゲノムDNAを含むP1クローン#13447のDNAは制限酵素BamHIとBglIII（宝酒造社製）で消化し、またプラスミドベクターpBluescriptII KS+はBamHIで消化した。これらを混合しT4 DNAリガーゼ（宝酒造社製）を加えてライゲーション反応させた。反応物を用いて大腸菌コンピテントセルDH5α（東洋紡績社製）

）を形質転換し、得られた大腸菌コロニーがヒトRecQ4ゲノムDNAの5'上流領域をもつかどうかをPCRによりスクリーニングした。5'上流領域を含むクローンのスクリーニングには、RecQ4ゲノムDNA配列の残基1399～残基1645の247 bpを増幅するセンスプライマー-Q4 S (5'-TCA CAA CTT CTG ATC CCT GGT GAG-3'/配列番号: 5)、およびアンチセンスプライマー-Q4 R (5'-GAG GGT CTT CCT CAA CTG CTA CAG-3'/配列番号: 6)を用いた。PCR反応溶液に、爪楊枝で採取したコロニーを加え、PCRは95℃ 5分の変性の後、94℃ 30秒(変性)、55℃ 30秒(アニーリング)、72℃ 30秒(伸長)の反応を35サイクル行い、最後に72℃ 5分反応させた。反応が終了したPCR反応溶液を2%アガロースゲルで電気泳動し、247 bpのバンドが検出されたコロニーを陽性とした。得られた陽性コロニーを3 mlのLB培地で培養し、アルカリ-SDS法によりプラスミドDNAを調製した。そしてこのプラスミドDNAを鋳型にし、プライマー-Q4 A14 (5'-CAA TGG GAG GCG TCA ACG TCA TCG-3'/配列番号: 7)およびQ4 A15 (5'-GAG GCG AAA GAG CGG AGG GTC CAG-3'/配列番号: 8)を用いてRecQ4ゲノムDNAの5'上流領域の塩基配列を決定した。RecQ4遺伝子の転写開始点はキャップサイトPCR法によりすでに決定されている(Kitao, S. et al., Genomics, 1998, vol. 54, pp443-pp452、特願平9-200387号)。キャップサイトPCR法は転写開始塩基を正確に決定する方法であり、ヒトWRN遺伝子の転写開始点もこの方法で決定された[Yamabe et al., Mol.Cell.Biol., 1998, vol. 18, pp6191-pp6200.]。決定された転写開始点はRecQ4ゲノムDNA塩基配列およびRecQ4 cDNA塩基配列の残基1に相当し、得られたRecQ4ゲノムDNAの5'上流領域の塩基配列を解析した結果、転写開始塩基から5'上流679 bp(配列番号: 1)を明らかにした。

【実施例3】 ロスムンドートムソン症候群患者におけるRecQ4ヘリカーゼ遺伝子の変異の検出

本発明者らは以前、RecQヘリカーゼファミリー遺伝子に属する2つの新規なヒトヘリカーゼ遺伝子RecQ4およびRecQ5をクローニングし、解析を行った(特願平9-200387号、特願平10-81492、およびKitao, S. et al., Genomics, 1998, vol.

54, pp443-pp452. 参照)。これら 2 つの新規遺伝子に加わり、ヒト RecQ ヘリカーゼ遺伝子ファミリーのメンバーは、RecQ1 (M. Seki et al., *Nucleic Acids Res.* 22:4566 (1994); K.L. Puranam et al., *J. Biol. Chem.* 269:29838 (1994)), BLM (N.A. Ellis et al., *Cell* 83:655 (1995)), WRN (C.-E. Yu et al., *Science* 272:258 (1996)), RecQ4 および RecQ5 の 5 つになった。

これら 5 つの RecQ ヘリカーゼ遺伝子のノーザンブロット解析を行ったところ、RecQ5 は RecQ1 と同様に調べた全ての組織や器官でユビキタスな発現が観察されたのに対し、RecQ4 は胸腺や精巣で発現が著しく高く、脾臓、小腸そして大腸でも高い発現が観察され、BLM と WRN に似た組織特異的な発現が認められた。BLM と WRN はそれぞれブルーム症候群およびウエルナー症候群の原因遺伝子であることから、RecQ4 遺伝子が何らかの疾患に関わっていると考え、ブルーム症候群およびウエルナー症候群に似た病状を示し、未だ原因遺伝子が同定されていないロスムンドートムソン症候群に注目した。そこで、リンダーらにより報告され、これまでにロスムンドートムソン症候群患者と分類されている 2 人の患者(兄弟)である II.3 および II.6 由来の細胞および DNA、そしてこれらの両親由来の細胞および DNA (N.M. Lindor et al., *Clin. Genet.* 49:124 (1996))、並びに上記ロスムンドートムソン症候群患者とは無関係な他のロスムンドートムソン症候群患者由来の細胞および DNA を用いて、RecQ4 遺伝子の変異を解析した。

具体的には、まず、Lindor らによって報告されている 2 人の RTS 患者、II.3、I.6 およびこれらの両親について、RecQ4 cDNA の全長オープンリーディングフレームと、RecQ4 遺伝子の全てのエキソン領域を PCR により増幅し、塩基配列の決定・比較を行った。

RecQ4 cDNA の全長オープンリーディングフレームを増幅するため、2 人の RTS 患者の線維芽細胞株から AGPC 法 [Chomczynski et al., *Analytical Biochemistry*, 1987, vol.162, pp.156-159] により total RNA を抽出し、Oligo(dT)30 セルロースピーズを用いて mRNA を調製し、続いて逆転写(RT)反応を行い cDNA を調製した。R

ecQ4 cDNAの全長オープンリーディングフレームは以下(表2)のPCR反応を行って増幅した。

表 2

1 次反応液組成：鋳型cDNA		1 μ l
20 μ M 各プライマー(A5/A7)		0.5 μ l \times 2
10 \times バッファー(Clontech社製)		2.5 μ l
2.5 mM dNTPs		2 μ l
DMSO		1.25 μ l
Klen Taq. polymerase(Clontech社製)		0.5 μ l
dH ₂ O		16.75 μ l
(total volume		25 μ l)
2 次反応液組成：1 次反応液		0.1 μ l
20 μ M 各プライマー(A6/A8)		0.5 μ l \times 2
10 \times バッファー(Clontech社製)		2.5 μ l
2.5 mM dNTPs		2 μ l
DMSO		1.25 μ l
Klen Taq. polymerase(Clontech社製)		0.5 μ l
dH ₂ O		17.65 μ l
(total volume		25 μ l)
反応条件：1 \times (94 $^{\circ}$ C 1 min)		
5 \times (94 $^{\circ}$ C 30 sec, 72 $^{\circ}$ C 4 min)		
5 \times (94 $^{\circ}$ C 30 sec, 70 $^{\circ}$ C 4 min)		
25 \times (94 $^{\circ}$ C 30 sec, 68 $^{\circ}$ C 4 min)		
1 \times (4 $^{\circ}$ C ∞)		
プライマー配列		
A5 5'-GAC GGC TGC GCG GGA GAT TCG CTG-3'/配列番号：15		
A6 5'-AGA TTC GCT GGA CGA TCG CAA GCG-3'/配列番号：33		
A7 5'-CAG GTT TTG CCC AGG TCC TCA GTC-3'/配列番号：34		
A8 5'-GTC ACT GCC CTA GCC TCT GAC AAC-3'/配列番号：35		

PCR産物はアガロースゲルから切り出して精製し、pCR2.1ベクター (Invitroge

n社製) にサブクロニングした。塩基配列決定はHattori ら [Electrophoresis 13, pp560-565 (1992)]により記載された PCRをベースにした方法により行った。即ち、Perkin Elmer社製の蛍光ダイデオキシターミネーターを含有するPRISM シークエンシングキットを使って反応を行った。塩基配列決定に用いたプライマーは以下(表3)の通り。

表3

Q4 A2	(5'-TTG GTC GCA GCC CGA TTC AGA TGG-3' /配列番号: 13)
Q4 U	(5'-AAT CTG GGA CCT CAC TGT GAC ATC-3' /配列番号: 31)
Q4 T	(5'-TCA TCT AAG GCA TCC ACC CCA AAG-3' /配列番号: 36)
Q4 S	(5'-TCA CAA CTT CTG ATC CCT GGT GAG-3' /配列番号: 5)
Q4 A9	(5'-CTC AGC CCC TCC AGT CAA GCT AGG-3' /配列番号: 16)
Q4 137s	(5'-GTT TCC TGA ACG AGC AGT TCG ATC-3' /配列番号: 37)
Q4 F	(5'-CTG GGC AGG AGC GTG CAG TCA TGC-3' /配列番号: 25)
Q4 714s	(5'-GCT GCC TCC AGT TGC TTT TGC CTG-3' /配列番号: 12)
Q4 975s	(5'-GGA CAC AGA CCA GGC ACT GTT GAC-3' /配列番号: 38)
Q4 E	(5'-GGG TAC AGC GAG CCT TCA TGC AGG-3' /配列番号: 23)
Q4 K	(5'-TCC TGG CTG TGA AGA GGC TGG TAC-3' /配列番号: 29)
Q4 H2	(5'-TTA GGA TCC CAG CTT ACC GTA CAG GCT TTG G-3' /配列番号: 28)
Q4 H1	(5'-TTA GGA TCC GGG GTG CTT GTG GAG TTC AGT G-3' /配列番号: 27)
Q4 2314s	(5'-CAG GCC AGA CTC CAG GAT TGG GAG-3' /配列番号: 39)

そしてApplied Biosystems社製のオートシーケンサー (モデル ABI 373) で塩基配列を読み取り、附属の Macintoshコンピュータによりデータを解析した。得られた2人のRTS患者の全長オープンリーディングフレームの塩基配列をDNA SIS塩基配列編集ソフトを用いて、すでに報告したRecQ4 cDNAの塩基配列 (特願平9-200387号) と比較した。

次にゲノムDNAからRecQ4遺伝子のエクソンを増幅するため、2人のRTS患者、I.3、II.6およびこれらの両親の培養繊維芽細胞をPBSで洗浄後、TNE buffer (50 mM Tris-Cl (pH 8.0), 100 mM NaCl, 1 mM EDTA)に懸濁し、等量のTNE buffer

+ 2% SDS + 200 μ g/ml Proteinase Kを加え、室温で1時間転倒混和した後、42°Cで一晩インキュベーションし、DNAの抽出を行った。これを等量のフェノールで抽出することを3回繰り返して除蛋白を行い、続いてエタノール沈殿によりゲノムDNAを得た。このゲノムDNAを鋳型にしてRecQ4遺伝子の第9、10、11エキソンを含む領域をセンスプライマーQ4 C8 (5'-GGA AAT GTG CTG GGA AAG GAG-3' / 配列番号: 18)とアンチセンスプライマーQ4 C5 (5'-ACC AGT GCC TCA GGT GTC A GC-3' / 配列番号: 17)を用いて、またRecQ4遺伝子の第13、14、15エキソンを含む領域をセンスプライマーQ4 E128 (5'-CTC GAT TCC ATT ATC ATT TAC TGC-3' / 配列番号: 24)とアンチセンスプライマーQ4 D1 (5'-CTC TTC ACA GCC AGG AA G TCC-3' / 配列番号: 40)を用いてPCRにより増幅した。PCRは95°C 5分の変性の後、94°C 30秒(変性)、60°C 30秒(アニーリング)、72°C 60秒(伸長)の反応を35サイクル行い、最後に72°C 5分反応させた。増幅されたDNA断片を精製し、これらを鋳型にしRecQ4遺伝子の第9、10、11エキソンを含む領域にはQ4 C8プライマーを用いて、またRecQ4遺伝子の第13、14、15エキソンを含む領域にはQ4 D3プライマー(5'-AGA GCT GGT GTC CCC GTG GAC-3' / 配列番号: 41)を用いて塩基配列を決定した。塩基配列決定法はHattori ら [Electrophoresis 13, pp560-565 (1992)] により記載された PCRをベースにした方法により行った。即ち、Perkin Elmer社製の蛍光ダイデオキシターミネーターを含有するPRISMシーケンシングキットを使って反応を行った。そしてApplied Biosystems社製のオートシーケンサー(モデル ABI 373)で塩基配列を読み取り、附属のMacintoshコンピュータによりデータを解析した。得られた患者およびそれらの両親の塩基配列をDNASIS塩基配列編集ソフトで比較した。

以上のようなRecQ4ヘリカーゼ遺伝子の塩基配列の解析により、下記に示すように、この家系の2人のロスムンドートムソン症候群患者は両者とも同じ、ヘテロの変異を有していることが判明した。図1(A)にこのロスムンドートムソン症候群患者の家系図を示し、図1(A)および図2にこの家系の変異解析の結果を示す。

1つの変異 (mut-1と称する) はエキソン10内に存在し、7塩基の欠失 (タンパク質コード領域の塩基配列の1650位から1656位のGGCCTGC(配列番号: 3の1734~1740位)) (図2(a))によりそれ以降で読み枠がシフトし、その結果14塩基下流に終結コドンTGAが生じていた。mut-1の変異部位を含むようにプライマーQ4 C1 (5'-TCT GGC CTG CCA CCG TGT CTC-3' / 配列番号: 42) およびプライマーQ4 C3 (5'-TGG TCA TGC CCG AGT GTA TGC-3' / 配列番号: 43) を設計し、これらを用いたPCRにより両親のDNA (I.1およびI.2)、および患者のDNA (II.3およびII.6) のRecQ4遺伝子のタンパク質コード領域の残基1624~1675(配列番号: 3の1708~1759位) (52 bp) の領域を増幅し、得られたDNA断片を15%のポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離して変異の解析をおこなった。その結果、mut-1変異の有無を電気泳動における泳動度の差として検出することができた (図1 (B))。この解析の結果、mut-1は母親に由来することが明らかとなった。

もう1つの変異 (mut-2と称する) は、タンパク質コード領域の残基2269(配列番号: 3の2353位)のCがTに変異したもので、もともとのCAG (Gln) がTAG終結コドンに変異していた (図2(b))。mut-1およびmut-2の両者ともRecQ4ヘリカーゼのヘリカーゼドメインで変異が起こっており、これらの欠損遺伝子の転写産物の翻訳が途中で終結し、コード領域全長から予想されるRecQ4ヘリカーゼの分子量133 kDaに比べ、はるかに小さいタンパク質 (それぞれ60 kDaおよび82 kDa) が生じると予想される。これらの変異解析の結果を表4にまとめ、予想される欠失タンパク質産物を図3に示した。この家系に属する他の被験者から調製したDNAについて同様のシーケンス解析を行った結果、mut-1はロスムンドートムソン症候群患者II.3およびII.6、並びに母親由来のI.2細胞で検出され、mut-2はロスムンドートムソン症候群患者II.3およびII.6、並びに父親由来のI.1細胞で検出された。すなわち、mut-1およびmut-2はそれぞれ母親および父親に由来しており、両方の変異は、表面的には健康な、1つの変異を有する両親から遺伝したことが確認された。

この家系に特異的に関連するこれらの変異に加え、ヘテロに複合した別の変異が、米国「National Institute of Aging (NIA)」の「Aging Cell Repository」(No. AG05013) に保管されている、上記の家系とは無関係なロスムンドートムソン症候群患者由来の細胞から見出された。変異の検出方法はRecQ4 cDNAの全長オープンリーディングフレームと、RecQ4遺伝子の全てのエキソン領域をPCRにより増幅、塩基配列を決定し、正常な配列と比較することにより行った。RecQ4 cDNAの全長オープンリーディングフレームの増幅、サブクローニング、および塩基配列決定は上述の通りである。またこの患者のRecQ4遺伝子のエクソンを増幅するため、上述の方法でこの患者の繊維芽細胞からゲノムDNAを調製した。このゲノムDNAを鋳型にしてRecQ4遺伝子の第14、15エキソンを含む領域をセンスプライマーQ4 D3 (5'-AGA GCT GGT GTC CCC GTG GAC-3'/配列番号:41)とアンチセンスプライマーQ4 D2 (5'-TGG GAA CAC GCG CTG TAC CAG-3'/配列番号:44)を用いてPCRにより増幅した。またRecQ4遺伝子の第12、13エキソンを含む領域をセンスプライマーQ4 D11 (5'-GCC TCA CAC CAC TGC CGC CTC TGG-3'/配列番号:45)とアンチセンスプライマーQ4 D12 (5'-GAC AGG CAG ATG GTC AGT GGG ATG-3'/配列番号:46)を用いてPCRにより増幅した。PCRの条件は上述の通りである。増幅されたDNA断片を精製し、これらを鋳型にしRecQ4遺伝子の第14、15エキソンを含む領域にはQ4 D2プライマーを用いて、またRecQ4遺伝子の第12、13エキソンを含む領域にはQ4 D11プライマーを用いて塩基配列を決定した。その結果、これらの変異は2塩基の欠損 (mut-3)、およびイントロン12とエキソン13の境界部にあるGがTに変異してスプライシングドナー配列が破壊される変異 (mut-4) であり、両者ともヘリカーゼドメインの下流で翻訳のフレームシフトが起こり、それぞれ881アミノ酸および794アミノ酸からなる欠失したタンパク質産物が生じると予想されることが判明した (表4および図3)。

表4

RTS患者細胞で見出されたRecQ4遺伝子の変異				
変異型	変異	エキソン	状況	由来
複合型ヘテロ接合体	1650 7塩基欠失(mut-1)	10	フレームシフト	メキシコ系アメリカ人
	C 2269 T(mut-2)	14	ナンセンス変異	
複合型ヘテロ接合体	2492 2塩基欠失(mut-3)	15	フレームシフト	白人
	3' スプライシング部位	13	フレームシフト	
	AG→AT(mut-4)			

mut-1およびmut-2変異を有するロスムンドートムソン症候群患者が、WRNヘリカーゼ遺伝子やBLMヘリカーゼ遺伝子にも変異を持っているか否かを調べるため、I I.3細胞およびAG05013細胞のポリ(A)+RNAを逆転写して得たcDNAを鋳型にしてこれらcDNAの全長オープンリーディングフレームをPCRにて増幅し塩基配列の解析を行った。WRN cDNAにおいて増幅した領域はGenBank accession No. L76937で示される188残基～4555残基、またBLM cDNAにおいて増幅した領域はGenBank accession No. U39817で表される57残基～4370残基であった。しかしながら、WRN遺伝子およびBLM遺伝子に変異は見出されなかったことから、WRN遺伝子およびBLM遺伝子はロスムンドートムソン症候群には関与していないと考えられる。以上の結果から、RecQ4遺伝子の変異はロスムンドートムソン症候群に関与しているといえる。さらに、正常WRNヘリカーゼまたは正常BLMヘリカーゼは、ロスムンドートムソン症候群患者においてRecQ4遺伝子の変異により引き起こされる欠損を補うことはできないことが示唆された。

以上のように本発明者らは、臨床的にロスムンドートムソン症候群と診断された7人の患者のDNAの変異を解析し、同じ家系に属するII.3およびII.6を含め3人の患者からRecQ4遺伝子の変異を見いだした。

【実施例4】 ロスムンドートムソン症候群患者細胞のノーザンブロット解析
RecQ4遺伝子の変異とロスムンドートムソン症候群の病因との関係を異なる観

点から確認するため、5人のロスモンド・トムソン症候群患者の細胞におけるRecQ4 mRNAと健常人のそれとの比較をノーザンブロット解析により行った（図4）。患者の繊維芽細胞から、まず全RNAの抽出をAGPC法[Chomczynski et al., Analytical Biochemistry, 1987, vol. 162, pp156-pp159]により行い、得られた全RNAからオリゴ(dT)ラテックスビーズを用いてpoly(A)+ RNAを精製した。poly(A)+ RNA 5 μ gを1%のアガロースゲルで電気泳動し、アルカリ変性した後ナイロンフィルターに転写した。RecQ4 cDNAの残基2013～残基2333 (GenBank accession No. AB006532)の321 bpの断片をPCRで増幅・精製し、Random Primer DNA Labeling Kit Ver.2 (宝酒造社製, code no. 6045)を用いて [α - 32 P] dCTPによりラジオアイソトープ標識したものをプローブとして、フィルターを5 \times SSPEバッファー、50% ホルムアミド、2% ラウリル硫酸ナトリウム (SDS)、10 \times デンハート溶液、100 μ g/mlサケ精子DNA、1 \times 10⁷ cpm/ml [α - 32 P] dCTP標識プローブDNAを含む溶液中で42 $^{\circ}$ Cで一晩インキュベーションした。また、フィルターの洗浄は、2 \times SSC-0.1% SDSで、室温3回行い、続いて0.2 \times SSC-0.1% SDSで、65 $^{\circ}$ C30分行った。放射活性の検出はBAS1500システム（富士フィルム製）によるオートラジオグラフィーにより行った。

その結果、約4 kbのRecQ4 mRNAのレベルは、健常人の繊維芽細胞（レーン1）に比べII.3由来の繊維芽細胞（レーン2）では有意に減少していた。欠損したmRNAが特異的に減少することは、ウェルナー患者由来の繊維芽細胞やエプスタイン・バー・ウイルス (Epstein-Barr virus) でトランスフォームしたBリンパ芽球様細胞におけるWRN遺伝子の発現でも観察されている (Y. Yamabe et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 236:151 (1997))。他の遺伝病においても、ナンセンスコドンは脊椎動物細胞においてRNA代謝に影響を及ぼし、欠損したmRNAの特異的分解が促進され、同様の発現低下調節が起こることが報告されている (L.E. Maquat, RNA 1:456 (1995); L.E. Maquat, Am. J. Hum. Genet. 59:279 (1996))。それに対し、2塩基の欠損と3' スプライス部位の変異をヘテロに複合して有するもう一人

の患者 (AG05013) から調製した mRNA のノーザンブロット解析では、正常なサイズと短いサイズの2種の mRNA が検出された (図 4、レーン 3)。短い方の mRNA は、スプライスドナー部位の変異により異常な選択的スプライシングが起きて生じたもので、この試料における RecQ4 mRNA の主要な分子種であると思われる。一方、RecQ4 遺伝子に変異が見つからなかった他の4人のロスムンドートムソン症候群患者のうち3人の RecQ4 遺伝子の転写産物 (レーン 4~6) は、正常人のもの (レーン 1) とほとんど同様であった。RecQ4 遺伝子の転写産物に関するこれらの結果は、DNA 配列の変異解析で得られた結論と一致しており、ロスムンドートムソン症候群患者である II.3、II.6、および AG05013 は RecQ4 遺伝子の変異が原因であることが確認された。

ロスムンドートムソン症候群の診断は、これまでのところ、患者と疑われる者に対する、どちらかという広い臨床所見を基に行われており、確実な信頼性の置けるものではなかった。7人のロスムンドートムソン症候群患者のうち RecQ4 遺伝子の変異が検出されなかった患者は、他の遺伝子 (群) に変異があるのか、またはロスムンドートムソン症候群との診断が誤っており似たような臨床所見を示す他の病気に属していることが示唆される。また、ロスムンドートムソン症候群の診断に用いられている臨床症状が広すぎるということも考えられる。いわゆるロスムンドートムソン症候群は、類似してはいるがしばしばあいまいな症状を示す患者に対し広く用いられている (E.M. Vennos et al., J.Am.Acad.Dermatol. 27:750 (1992); E.M. Vennos and W.D. James, Dermatol.Clinics. 13:143 (1995))。RecQ4 遺伝子配列を用いた遺伝子診断により、ロスムンドートムソン症候群をより正確に診断することができると考えられる。

【実施例 5】 抗 RecQ4 ヘリカーゼモノクローナル抗体の作製

RecQ4 の C 末端領域をコードする配列番号 : 3 の 2803-3711 を含む DNA 断片を、大腸菌発現ベクターの pQE30 プラスミド (QIAGEN 社製) の lac promoter/operator の下流に挿入し、このプラスミド DNA を用いて、lac repressor をコードするプラス

ミドを保持した大腸菌M15株を形質転換させた。この形質転換体を、100 $\mu\text{g/ml}$ アンピシリン、25 $\mu\text{g/ml}$ カナマイシンを含むLB培地 (1% Bacto tryptone, 0.5% yeast extract, 0.5% NaCl, pH 7.0) で培養し、菌体濁度 O.D.600=0.6-0.7の時に 1 mM IPTG (isopropyl b-D-thiogalactopyranoside) を加えて発現を誘導した。

遠心によって大腸菌を集菌し、2% NP-40を含む Buffer A (50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 2 mM EDTA, 0.1 mM DTT, 5% glycerol, 1 mM PMSF) 中で超音波処理によって溶解し、さらに遠心分離を2回繰り返すことにより不溶沈殿画分を得た。この沈殿画分を Buffer A に懸濁し、等量の 1 M sucrose, 二容量のPercoll (SIGMA社製、colloidal PVP coated silica for cell separation) とよく混合して超遠心 (Beckman 超遠心機 L7-65, SW28ローター, 20000 rpm, 15°C, 30 min) を行い、最下層の蛋白封入体を得た。これを50 mM Tris-HCl (pH 8.0) で4回洗浄し、Buffer G (6 M guanidine-HCl, 0.1 M NaH_2PO_4 , 0.01 M Tris, pH 8.0) に溶解した後、透析により Buffer G から Buffer B (8 M~1 M urea, 0.1 M NaH_2PO_4 , 0.01 M Tris, pH 8.0) に置換し、さらにPBSに置換した。透析後、遠心式簡易濃縮/脱塩器 CENTRIPLUS 10 (Amicon社製) を用いて遠心濃縮した。以上の操作により RecQ4ヘリカーゼのC末端領域 (配列番号: 3の2803-3711, 配列番号: 4 (アミノ酸配列) の907~1208) の組換え蛋白質が得られた (図5)。

初回免疫として、精製した組み換えタンパク質 50 μg を Freund complete adjuvant と混合し、BALB/cマウス (7週齢、雌) の腹腔内に投与した。初回免疫から23日後に2回目の免疫として、精製した組み換えタンパク質 50 μg を Freund incomplete adjuvant と混合し腹腔内に投与した。2回目の免疫から30日後に最終免疫として、精製した組み換えタンパク質 25 μg を静脈内に投与し、その3日後に脾臓を摘出した。分離した脾臓細胞とミエローマ細胞株NS-1をポリエチレングリコール存在下で融合させ、HAT選択培地に懸濁して 100 μl ずつ96ウェルプレートに捲き込み (全560ウェル) 培養した。ハイブリドーマの抗体産生を確認するた

め、1次スクリーニングとして精製した組み換えRecQ4ヘリカーゼタンパク質を抗原とした抗原固相ELISA法により560ウェルの培養上清を調べた結果、450ウェルが陽性であった。これらのうちELISAの測定値が高い55ウェルについて培養を続け、1次スクリーニングと同様に抗原固相ELISA法により2次スクリーニングを行った結果、55ウェルすべてが陽性と判定された。ELISAの測定値が上位から14ウェルについて限界希釈法でハイブリドーマをクローニングし、ELISA法で陽性のクローンをモノクローナル抗体産生クローンとして樹立した。樹立されたハイブリドーマをBALB/cマウスに接種し腹水化し、腹水より硫酸塩析法にて抗体精製を行った。このようにして得られた14クローンの一つ、K6314を抗RecQ4ヘリカーゼモノクローナル抗体として以降の実験に用いた。

〔実施例6〕 ロスムンドートムソン症候群患者細胞のウエスタンブロット解析
ヒト正常細胞およびロスムンドートムソン症候群患者由来細胞を用いて、RecQ4タンパク質のウエスタンブロット解析を行った。健常人および患者から初代培養として分離した線維芽細胞をSV40 large-T抗原で形質転換し、培養細胞株とした。これらの培養細胞をPBSで洗浄後、TNE (40 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA)に懸濁し遠心回収した。さらにLysis buffer (50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 0.5% NP-40, 1 mM PMSF)に懸濁した後4°Cで30分間転倒混和し、遠心分離によって得られる上清を全細胞抽出液とした。蛋白濃度はBIO-RAD社製、Protein Assay DyeReagent Concentrateを用いて測定した。

調製した全細胞抽出液を用いたSDS-PAGE (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis)は、Laemmliの方法 [Laemmli (1970) Nature, vol. 227, p680-685)]に従った。電気泳動によりタンパク質をゲル内で分離した後、トランスファーバッファー (20% methanol, 4.8 mM Tris, 3.9 mM glycine, 3.75% SDS) 中で、TRANS-BLOT SD (BIO-RAD社製)を用いて、室温、20 V、1時間、ゲル内の蛋白質を電氣的にニトロセルロースフィルター (Imobilon transfer membrane, MILLIPORE社製)に転写した。このフィルターを5% skim milk/PBS溶液中でブロッキングし

、1次抗体反応を室温で2時間行い、0.05% Tween 20/PBS溶液 (PBS-T)で洗浄した。続いて2次抗体反応を室温で1時間行いPBS-Tで洗浄した後、ECL Western blotting detection reagents (Amersham社製) を用いて検出を行った。

1次抗体には、2 $\mu\text{g/ml}$ マウス抗RecQ4ヘリカーゼモノクローナル抗体K6314、0.2 $\mu\text{g/ml}$ ヤギ抗アクチンポリクローナル抗体sc-1616 (Santa Cruz Biotechnology社製) のPBS溶液を用い、2次抗体には、DAKO社製のHorseradish peroxidase標識のウサギ抗マウスイムノグロブリンポリクローナル抗体0.65 $\mu\text{g/ml}$ 、またはウサギ抗ヤギイムノグロブリンポリクローナル抗体0.25 $\mu\text{g/ml}$ をそれぞれ含む5% skim milk/PBS溶液を用いた。

正常細胞 (WI38/SV40) の全細胞抽出液を用いたウエスタンブロット解析の結果、分子量約160 kDと約140 kDの2本のバンドが検出された (図6、レーン1)。160kDの大きさはRecQ4遺伝子がコードする1208アミノ酸から予想される133 kDより大きいことから、リン酸化などのタンパク質レベルにおける何らかの修飾を受けていることが考えられた。

患者細胞では、変異解析の結果から予想された通り、C末端に対する抗体ではRTS-B, EにRecQ4ヘリカーゼタンパク質は検出されなかった (図6、レーン2、3)。以上の結果からモノクローナル抗体K6314は抗RecQ4ヘリカーゼタンパク質を特異的に認識することが確認された。またRTS-C, Fは、ロスマンドートムソン症候群であるがRecQ4遺伝子に変異が認められなかった患者由来の細胞で、正常細胞と同様にRecQ4ヘリカーゼタンパク質が検出された (図6、レーン4、5)。これらの結果から、抗RecQ4ヘリカーゼモノクローナル抗体K6314を用いたウエスタンブロット解析により、症状からロスマンドートムソン症候群と診断された患者がRecQ4遺伝子に変異をもつかどうかを免疫学的に診断可能である。

[実施例7] 蛍光抗体法による培養細胞の免疫染色

前述のK6314抗体を用いた蛍光抗体染色法によりRecQ4タンパク質の細胞内局在の解析を行った。ヒト慢性骨髄性白血病細胞株K562、 0.5×10^5 個 (対数増殖期)

をサイトスピン (TOMY精工社製、遠心法浮遊細胞収集装置、MODEL, SC-2) を用いて、スライドガラス (MATSUNAMIガラス社製、APSコート付Micro Slide Glass) に吸着させ、3.7% formaldehyde/PBS溶液中で、室温10分間固定し、PBS-T (0.05% Tween 20/PBS溶液) で洗浄後、0.1% Triton X-100/PBS溶液中で、室温 5 分間細胞膜の浸透化を行った。3% skim milk/PBS溶液中で室温 1 時間、ブロッキングを行った後、1 次抗体反応として、5 $\mu\text{g/ml}$ 抗RecQ4抗体 K6314/PBS+0.1% BSA+0.05% NaN_3 溶液中4°Cで、一晩のインキュベーションを行い、PBS-Tで洗浄し、2 次抗体反応として、7.5 $\mu\text{g/ml}$ ビオチン標識抗マウスイムノグロブリン抗体 (Chemicon社) 溶液中、室温 1 時間のインキュベーションを行った。PBS-Tで洗浄後、5 $\mu\text{g/ml}$ の FITC標識したストレプトアビジン (Pharmingen社) 溶液中、室温 1 時間のインキュベーションを行い、PBS-Tで洗浄した。2 $\mu\text{g/ml}$ DAPI/50% glycerol 溶液で、試料の封入とDAPIによる染色体の対比染色を行った。検鏡は、Olympas 社製、走査型レーザ生物顕微鏡、FLUOVIEW system BX50を用いて行った。

その結果、RecQ4タンパク質は核内の核質全体に非常に細かい粒状に検出された (図 7)。この結果はRecQ4タンパク質が核内で機能することを示しており、K6314抗体はRecQ4ヘリカーゼの機能解析に有用である。

産業上の利用の可能性

本発明により、ロスムンドートムソン症候群はRecQ4ヘリカーゼ遺伝子の変異により生じる遺伝病であることが明らかとなった。これによりRecQ4ヘリカーゼ遺伝子、その配列に基づくプライマー若しくはプローブ、RecQ4ヘリカーゼ、およびその抗体などを利用した、ロスムンドートムソン症候群の確定診断、出生前診断などを含むロスムンドートムソン症候群の検査、および遺伝子治療を含むロスムンドートムソン症候群の治療を行うことが可能となった。

請求の範囲

1. RecQ4ヘリカーゼをコードするゲノムDNA。
2. 請求項 1 に記載のゲノムDNAを含むベクター。
3. 請求項 2 に記載のベクターを保持する宿主細胞。
4. RecQ4ヘリカーゼをコードするDNAまたはその発現調節領域にハイブリダイズし、少なくとも15ヌクレオチドの鎖長を有する、ロスムンドートムソン症候群の検査に用いるためのDNA。
5. RecQ4ヘリカーゼをコードするDNAを有効成分とする、ロスムンドートムソン症候群治療薬。
6. RecQ4ヘリカーゼを有効成分とする、ロスムンドートムソン症候群治療薬。
7. RecQ4ヘリカーゼに結合する抗体を有効成分とする、ロスムンドートムソン症候群検査薬。
8. RecQ4ヘリカーゼをコードするDNAまたはその発現調節領域の変異を検出することを特徴とする、ロスムンドートムソン症候群の検査方法。
9. 請求項 8 に記載のロスムンドートムソン症候群を検査する方法であって、
 - (a) 患者からDNA試料を調製する工程、
 - (b) 請求項 4 に記載のDNAをプライマーとして用いて患者由来のDNAを増幅し、塩基配列を決定する工程、
 - (c) 決定した塩基配列を健常者の対照と比較する工程、を含む方法。
10. 請求項 8 に記載のロスムンドートムソン症候群を検査する方法であって、
 - (a) 患者からRNA試料を調製する工程、
 - (b) 大きさに応じて調製したRNAを分離する工程、
 - (c) 請求項 4 に記載のDNAをプローブとして用いて、分離したRNAに対しハイブ

リダイズさせる工程、

(d) ハイブリダイズしたRNAを検出し、健常者の対照と比較する工程、を含む方法。

11. 請求項8に記載のロスムンドートムソン症候群を検査する方法であって、

(a) 患者からDNA試料を調製する工程、

(b) 請求項4に記載のDNAをプライマーとして用いて患者由来のDNAを増幅する工程、

(c) 増幅したDNAを一本鎖DNAに解離させる工程、

(d) 解離させた一本鎖DNAを非変性ゲル上で分離する工程、

(e) 分離した一本鎖DNAのゲル上での移動度を健常者の対照と比較する工程、を含む方法。

12. 請求項8に記載のロスムンドートムソン症候群を検査する方法であって、

(a) 患者からDNA試料を調製する工程、

(b) RecQ4ヘリカーゼをコードするDNAまたはその発現調節領域中におけるロスムンドートムソン症候群に特異的な変異塩基と塩基対を形成する塩基を含むオリゴヌクレオチドをプライマーの少なくとも一つとして用いて患者由来のDNAを増幅する工程、

(c) 増幅したDNA断片を検出する工程、を含む方法。

13. 請求項8に記載のロスムンドートムソン症候群を検査する方法であって、

(a) 患者からDNA試料を調製する工程、

(b) ロスムンドートムソン症候群に特異的な変異塩基を挟み込むように調製された一対の請求項4に記載のDNAをプライマーとして用いて、患者由来のDNAを増

幅する工程、

(c) 得られた増幅産物に対し、下記の(i)から(iv)のいずれかの一対のオリゴヌクレオチド；

(i) 増幅産物中の変異塩基と塩基対を形成する塩基が3'末端となるように合成したオリゴヌクレオチドおよび該3'末端の隣りの塩基(3'側)が5'末端となるように合成したオリゴヌクレオチド、

(ii) 増幅産物中の変異塩基に対応する健常者における塩基と対を形成する塩基が3'末端となるように合成したオリゴヌクレオチドおよび該3'末端の隣りの塩基(3'側)が5'末端となるように合成したオリゴヌクレオチド、

(iii) 増幅産物中の変異塩基と塩基対を形成する塩基が5'末端となるように合成したオリゴヌクレオチドおよび該5'末端の隣りの塩基(5'側)が3'末端となるように合成したオリゴヌクレオチド、

(iv) 増幅産物中の変異塩基に対応する健常者における塩基と対を形成する塩基が5'末端となるように合成したオリゴヌクレオチドおよび該5'末端の隣りの塩基(5'側)が3'末端となるように合成したオリゴヌクレオチド、
をハイブリダイズさせ、これらオリゴヌクレオチドを連結する工程、および

(d) 連結したオリゴヌクレオチドを検出する工程、
を含む方法。

14. 請求項8に記載のロスムンドートムソン症候群の検査方法であって、

(a) 患者からタンパク質試料を調製する工程、

(b) RecQ4ヘリカーゼに対する抗体を、調製したタンパク質試料に接触させる工程、

(c) 該抗体に結合するタンパク質を検出する工程、
を含む方法。